

(11)Publication number : 2002-112764
 (43)Date of publication of application : 16.04.2002

(51)Int.Cl. C12N 5/10
 C12N 15/09
 C12Q 1/02
 C12Q 1/68
 G01N 33/15
 G01N 33/50
 // A61K 45/00
 (C12N 5/10
 C12R 1:91)
 (C12Q 1/02
 C12R 1:91)

(21)Application number : 2000-305728 (71)Applicant : TOHOKU TECHNO ARCH CO LTD
 (22)Date of filing : 05.10.2000 (72)Inventor : TAMAI MAKOTO

TOMITA HIROSHI
 TATEWAKI MASUO
 UEDA MASAJI

(54) ESTABLISHED RETINAL NERVE CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a retinal nerve cell strain usable for developing a useful medicine for retinal diseases.

SOLUTION: This retina-derived nerve cell strain capable of maintaining a passage is derived from a transgenic animal to which a temperature-sensitive mutant SV40 large-T antigen gene is transferred, especially preferably a transgenic rat and can establish, for example, a retinal gangliocyte, amacrine cell, horizontal cell, visual cell. The obtained established retina-derived nerve cell is useful for screening a medicine acting on ophthalmologic diseases (medicine for age-related macular degeneration, retinitis pigmentosa, glaucoma, diabetic retinopathy, or the like).

* NOTICES *

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Passage maintenance is possible and it is a neural cell line of retina origin.

[Claim 2] The cell strain according to claim 1, wherein this neural cell line is chosen from a group which comprises a retinal ganglion cell, an amacrine cell, a horizontal cell, and visual cells.

[Claim 3]The cell strain according to claim 1 or 2, wherein neural cell lines are the stock-ized visual cells which have revealed a gene chosen from a group which comprises opsin, a transducin, an S antigen, HOSUDEYUSHIN, and rhodopsin.

[Claim 4]The cell strain according to claim 1 or 2, wherein a neural cell line is the stock-ized retinal ganglion cell which has revealed Thy 1.1 antigen gene.

[Claim 5]The cell strain according to claim 1 or 2, wherein a neural cell line is the stock-ized amacrine cell which has revealed microtuble-associated protein 2 gene.

[Claim 6]The cell strain according to claim 1 or 2, wherein a neural cell line is the stock-ized horizontal cell which has revealed calbindin D28 gene.

[Claim 7]A cell strain of any 1 statement of claims 3-6, wherein gene expression is measured by RT-PCR assay.

[Claim 8]A cell strain of any 1 statement of claims 1-7 being things of rat origin.

[Claim 9]How to obtain a neural cell line in which passage maintenance of retina origin using an eyeball of temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics mammalian is possible.

[Claim 10]A method of using a nerve net film separated from an eyeball of temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics mammalian according to claim 9.

[Claim 11]An establishment method of a neural cell line in which passage maintenance of retina origin is possible characterized by performing sorting cloning to a nerve cell of the retina using a specific marker using the retina of temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics mammalian.

[Claim 12]A method according to claim 11 which uses rhodopsin, sorts out visual cells as a marker using an anti-rhodopsin antibody, and is characterized by obtaining stock-ized visual cells.

[Claim 13]A method according to claim 11 which uses Thy 1.1 antigen, sorts out a ganglion cell as a marker using an anti-Thy 1.1 antigen antibody, and is characterized by obtaining a stock-ized ganglion cell.

[Claim 14]microtuble-associated protein 2 is used as a marker, A method according to claim 11 which sorts out an amacrine cell using anti-microtuble-associated protein 2 antibody, and is characterized by obtaining a stock-ized amacrine cell.

[Claim 15]A method according to claim 11 which uses calbindin D28, sorts out a horizontal cell as a marker using anti-calbindin D28 antibody, and is characterized by obtaining a stock-ized horizontal cell.

[Claim 16]It is a measuring method of bioactive over a nerve cell of the retina in a sample, and (i) passage maintenance is possible, and a neural cell line of retina origin is used, and it is (ii). The above maintained under (a) sample existence conditions A cell of (i), (b) The above maintained under conditions in which a sample does not exist This measuring method comparing a cell of (i).

[Claim 17]An identification method of a compound which has the bioactive over a nerve cell of the retina characterized by comprising the following.

(i) (a) When passage maintenance is possible and a neural cell line of retina origin is contacted to a sample compound under conditions that a neural cell line of this retina origin is maintainable.

(b) Under conditions that a neural cell line of this retina origin is maintainable, passage maintenance is possible, compare a case where a neural cell line of retina origin is held under a condition in which this sample compound does not exist, or it is (ii). (a) passage maintenance is possible and it is a sample compound about a neural cell line of retina origin.

When making it contact under conditions to which a function of a nerve cell of the retina is made to fall.

(b) Passage maintenance is possible, and compare a case where it holds under conditions to which a function of a nerve cell of the retina is made to fall without this sample compound's existing a neural cell line of retina origin, and this sample compound measures whether it has the bioactive over a nerve cell of the retina.

[Claim 18]A method according to claim 17, wherein a compound which has the bioactive over a nerve cell of the retina is agonist or an antagonist to a receptor revealed to a nerve cell of the

retina.

[Claim 19] A way a neural cell line of retina origin of any 1 statement of a way temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics mammalian of any 1 statement of claims 9-15 is a temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics rat, or claims 16-18 is of rat origin.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention is a nerve cell which exists in the retina of an eye, and relates to the cell (especially rat origin cell) in which subculture is possible. The cell by which the nerve cell to which especially this invention exists in the retina of an eye was stock-sized (especially) The side effects are related with a cell strain available although the drug which poses a problem is screened by screening of the ophthalmology illnesses (age-related-macular-degeneration, retinitis pigmentosa, glaucoma, diabetic retinopathy, etc.) agonist thing using a rat origin cell and this cell, the retina of an eye, etc. It is related with a cell strain available although the drugs (age-related-macular-degeneration medicine, retinitis pigmentosa medicine, a glaucoma drug, diabetic retinopathy medicine, etc.) which made the target various receptors revealed to the nerve cell which exists in the retina of an eye are screened. It is related with a cell strain available although the drug which made the target the obstacles (age-related macular degeneration, retinitis pigmentosa, glaucoma, diabetic retinopathy, etc.) of the nerve cell which exists in the retina of an eye is screened.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is thought that the retina is an organization which has the function to transmit a stimulus of the light from the external world to a brain, and is a part of brain tissue which is directly in contact with the external world. And the retina has the function which specialized highly and differing also from the organization of other vitreous bodies in an eye is accepted. It is known by the retina as a nerve cell a ganglion cell, an amacrine cell, a horizontal cell, a bipolar cell, visual cells, and that the Muller cell and astrocyte exist as a neuroglia. Such the retina from bringing about a result with a fatal injury over it. Symptoms cannot be grasped by performing a biopsy clinically, and in the living body, since it is a very small organization, it is an organization with the peculiarity that the abnormality cannot be obtained from the systemic inspection of a blood test etc. Glaucoma is mentioned to a thing famous as a disease in this retina. Now, the glaucoma prevalence rate of 40 or more years old in Japan is made into 3.5%, this glaucoma prevalence rate increases further with aging, and a glaucoma patient is presumed to reach about 200 everybody, considering the population of our country. When it sees according to typus morbi, normal tension glaucoma (NTG) exists by the frequency of 3 times or more to nuclear power plant open-angle glaucoma (POAG) being observed, and, in the case of Japanese people, it is occupying about 70% of all the glaucoma patients. As a glaucomatous cause,

conventionally, hypertonia bulbi was made into the main cause, the chief aim set to intraocular pressure descent symptomatically as the therapy, and an intraocular pressure depressant and the aqueous humor filtering operation were performed. However, it is reported in recent years that it is shown that the specific cell death of apoptosis exists in retinal neuronal cell death, and a typical apoptosis view is shown by experimental glaucoma. In NTG, the cell death by apoptosis is expected to involve deeply from the clinical picture. In NTG, development of not only the conventional intraocular pressure downward therapy but a "nerve defense" therapy and establishment are hurried from such a flow. With the disease shown not only in glaucoma but in the 1st table, the nerve cell by which an obstacle is mainly carried out is identified, and it is thought that establishment of the retinal nerve cell in which passage maintenance is possible raises development of the remedy to these diseases by leaps and bounds.

[0003]

[Table 1]

下記に網膜疾患で主に障害される神経細胞を示す。

網膜疾患名	主に障害される神経細胞
緑内障	神経節細胞
糖尿病性網膜症	アマクリン細胞
中心動脈閉塞症など 虚血性疾患	神経節細胞 アマクリン細胞
加齢黄斑変性症、 網膜色素変性症	視細胞

[0004] However, under a culture condition, since even maintenance is difficult not to mention a passage, in many cases, the retinal nerve cell has been performed for research and development of the drug which has a neuroprotective action by the animal experiment model. In order to consider the protective action of one drug, actually, Many animals, especially at least 20 or more rats have been used (in addition with the mouse, many rats or rabbits to an experiment have been used in the ophthalmologic field from a thing, like an eyeball is too small, operation is very difficult, or the observation in the effect judging of a drug, etc. is difficult, and there is). However, there is a limit by the technique of using an animal as it is. By the way, as a conventional established cell line establishing method, it is 1. Culturing a primary culture cell is continued for a long period of time, and the method of introducing into a primary culture cell oncogenes which obtain the cell which gained reproductive integrity, such as a method and 2 SV40, and carrying out immortalization, etc. are mentioned. However, by the method of 1, in spite of taking time, the target cell is not necessarily obtained. By the method of 2, there is a fault, like there is a difference of a chromosomal transfer position in that transgenics happens only to the cell of fecundity and each cell. Therefore, it is difficult to obtain as an immortal cell stock which has revealed this character or the function, without harming the cell which differed for every body tissue and has revealed a unique character or function in each organization for the character.

[0005] As a method of conquering the problem of the established cell line establishing method of these former, the cell of the target organization is isolated from the transgenic mouse which introduced oncogenes, such as SV40, An established cell line. The method of obtaining. It was developed [Yanai N. et al., Exp. Cell. Res., 197, 50-56 (1991); Yanai N. et al., Jpn. J. Cancer Res., 82, 1344-1348 (1991)]. Since an oncogene required for immortalization is included in the cell from the beginning, this method is expected to be able to establish the established cell line holding a differentiation character by high frequency considerably. however -- while passage maintenance can be performed in practice -- a character peculiar to each body tissue -- it is not easy to stock-ize the cell holding - function. The cell in particular that exists in the retina had not succeeded in it until now, in spite of having demanded strongly establishment of the established cell line which can perform the passage maintenance from the peculiarity. Although it is necessary to use a rat organization, creation of a transgenic rat also has the situation of not being easy in research of retina tissue.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The research and development of the drug to an ophthalmology illness, for example, age-related macular degeneration, retinitis pigmentosa, glaucoma, diabetic retinopathy, etc., The drug which made the target various receptors revealed to the nerve cell which exists in the retina, For example, an age-related-macular-degeneration remedy, a retinitis pigmentosa remedy, a glaucoma remedy, The obstacle or the research of abnormalities produced in the nerve cell which exists in the research and development of remedies, such as a diabetic retinopathy remedy, and the retina, Furthermore, it is related with using for such an obstacle or the research and development of the drug which receives unusually and acts, or being a nerve cell which exists in the retina of an eye available to screening of this drug, etc., establishing the rat origin cell in which subculture is possible, and providing.

[0007]

[Means for Solving the Problem] This invention persons perform extensive research and search that a retinal nerve cell in which passage maintenance is possible should be established, As a result, if a transgenic animal which introduced a temperature-sensitive mutant SV40 large T antigen gene, and a transgenic rat which introduced a temperature-sensitive mutant SV40 large T antigen gene preferably especially are used, It found out that it was possible to obtain a retinal nerve cell in which passage maintenance is possible, and resulted in this invention. That is, this invention relates to a retinal nerve cell in which passage maintenance is possible. this invention -- a retinal nerve cell of transgenic animal origin of temperature-sensitive mutant SV40 large T antigen transgensics -- it is more preferably related with a retinal nerve cell of transgenic rat origin of temperature-sensitive mutant SV40 large T antigen transgensics. This invention relates also to development of a drug and screening which have a neuroprotective action to various retina diseases which uses a retinal nerve cell in which this passage maintenance is possible. This invention is a large T antigen gene of a temperature-sensitive mutant of SV40, for example, a stock-sized retinal nerve cell which is the transgenic animal origin which introduced SV40tsA58, and relates to what was chosen from a group which comprises following cell:ganglion cell, amacrine cell, horizontal cell, and visual cells. Especially this invention is SV40tsA58. It is a stock-sized retinal nerve cell which is of transgenic rat origin which introduced a gene, and is related with what was chosen from a group which comprises following cell:ganglion cell, amacrine cell, horizontal cell, and visual cells.

[0008][1]Passage maintenance is possible and it is a neural cell line of retina origin.; [2]The above, wherein this neural cell line is chosen from a group which comprises a retinal ganglion cell, an amacrine cell, a horizontal cell, and visual cells [1]Cell strain of a statement; [3]The above, wherein neural cell lines are the stock-sized visual cells which have revealed a gene chosen from a group which comprises opsin, a transducin, an S antigen, HOSUDEYUSHIN, and rhodopsin [1]or[2]Cell strain of a statement; [4]The above, wherein a neural cell line is the stock-sized retinal ganglion cell which has revealed Thy 1.1 antigen gene [1]or[2]Cell strain of a statement; [5]The above, wherein a neural cell line is the stock-sized amacrine cell which has revealed microtuble-associated protein 2 gene [1]or[2]Cell strain of a statement; [6]The above, wherein a neural cell line is the stock-sized horizontal cell which has revealed calbindin D28 gene [1]or[2]A cell strain of a statement.

[7]The above, wherein gene expression is measured by RT-PCR assay [3]-Cell strain of any 1 statement of [6]; [8]The above being a thing of rat origin [1]-Cell strain of any 1 statement of [7]; [0009][9]How to obtain a neural cell line in which passage maintenance of retina origin using an eyeball of temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgensics mammalian is possible; [10]The above using a nerve net film separated from an eyeball of temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgensics mammalian [9]A method of a statement; [11] An establishment method of a neural cell line in which passage maintenance of retina origin is possible characterized by performing sorting cloning to a nerve cell of the retina using a specific marker using the retina of temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgensics mammalian; [12]The above, wherein a marker is chosen from a group which comprises opsin, a transducin, an S antigen, HOSUDEYUSHIN, and rhodopsin [11]A method of a statement; [13]The above which uses rhodopsin, sorts out visual cells as a marker using an anti-rhodopsin antibody, and is characterized by obtaining stock-sized visual cells [11]A method of a statement; [14]The

above which uses Thy 1.1 antigen, sorts out a ganglion cell as a marker using an anti-Thy 1.1 antigen antibody, and is characterized by obtaining a stock-sized ganglion cell [11]A method of a statement; [15]The above which uses microtubule-associated protein 2, sorts out an amacrine cell as a marker using anti-microtubule-associated protein 2 antibody, and is characterized by obtaining a stock-sized amacrine cell [11]A method of a statement; [16]The above which uses calbindin D28, sorts out a horizontal cell as a marker using anti-calbindin D28 antibody, and is characterized by obtaining a stock-sized horizontal cell [11]A method of a statement.

[0010][17]It is a measuring method of bioactive over a nerve cell of the retina in a sample, and (i) passage maintenance is possible, and a neural cell line of retina origin is used, and it is (ii). (a) The above maintained under sample existence conditions A cell of (i), (b) The above maintained under conditions in which a sample does not exist This measuring method comparing a cell of (i); [18]It is an identification method of a compound which has the bioactive over a nerve cell of the retina, and is (i). (a) passage maintenance is possible and a neural cell line of retina origin under conditions that a neural cell line of this retina origin is maintainable, A case where a sample compound is made to contact, and (b) Under conditions that a neural cell line of this retina origin is maintainable, Passage maintenance is possible, a case where a neural cell line of retina origin is held under a condition in which this sample compound does not exist is compared, or it is (ii). (a) passage maintenance is possible and a neural cell line of retina origin Sample compound, A case where it is made to contact under conditions to which a function of a nerve cell of the retina is made to fall, and (b) Passage maintenance is possible and and a neural cell line of retina origin, Identification method which consists of comparing a case where it holds under conditions to which a function of a nerve cell of the retina is made to fall without this sample compound's existing, and this sample compound measuring whether it has the bioactive over a nerve cell of the retina; [19]The above, wherein a compound which has the bioactive over a nerve cell of the retina is agonist or an antagonist to a receptor revealed to a nerve cell of the retina [18]A method of a statement; [20]Above[18]Agonist or an antagonist to a receptor revealed to a nerve cell of the retina being a new compound identified by a method of a statement, and being a compound which has the bioactive over a nerve cell of the retina; It reaches. [21]Above[9]—A method or the above, wherein passage maintenance of any 1 statement of [16] is possible and a neural cell line of retina origin is obtained from temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics mammalian, especially a temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics rat [17]—How its neural cell line of retina origin of any 1 statement of [19] is of rat origin is provided.

[0011]Probably, the purpose of others of this invention, the feature, excellency, and its viewpoint it has will be clearer to a person skilled in the art than the following statements. However, please understand that a statement of this specification including the following statements and a statement of a concrete example etc. is what shows a desirable mode of this invention and is shown only for explanation. Probably, it will be easily clear to a person skilled in the art by knowledge from portions of the following statements and others of this specification to make various change and/or changes (or ornamentation) by an intention of this invention indicated on these specifications and within the limits. All the patent documents and references which are quoted on these specifications are quoted for the purpose of explanation, and as some of these specifications, they include the contents herein and should be interpreted.

[0012]

[Embodiment of the Invention]The method of isolating, culturing the cell of the target organization as the establishment method of the established cell line of this invention, from the transgenic animal which introduced an oncogene, and establishing an established cell line is mentioned. As an oncogene to introduce, the large T antigen gene of the temperature-sensitive mutant of SV40, for example, SV40tsA58 etc., is mentioned. A transgenic rat etc. are mentioned as a transgenic animal. As long as an organization is suitable for a retinal nerve cell coming to hand and it is suitable for extraction, what kind of organization may be used, but the retina of an eyeball organization, especially an eye, etc. are usually mentioned. An organization is extracted from an above-mentioned transgenic animal, A cell. Enzymatic process [(Ichikawa N.et al., J. Pharmacol. Toxicol. Method. 36: 45-52 (1996); Goldstein G.W.et al., J. Neurochem. 25 : 715-717

(1975); Meyer J. et al., J. Neurochem. 57 : 1971-1977(1991)] dissociates and recovers, and it cultivates. The concentration and the screening method, colony formation assay [Endocrinology 136 for which cloning of the cell used the specific antibody after culture : It is carried out by 4084-4091] (1995), limiting dilution, etc., and an established cell line can be established after several times of cloning. The thing using the specific antibody to the marker which target cells have revealed specifically is mentioned to sorting using a specific antibody of the purpose cell. In obtaining the cell in which passage maintenance is possible from a transgenic rat, it is possible to use the antibody produced with the mouse or the rabbit, and it excels. As this marker, opsin, a transducin, an S antigen, HOSUDEYUSHIN, rhodopsin, Thy 1.1 antigen, microtubule-associated protein2, calbindin D28, etc. are mentioned. The existence of a manifestation of the above-mentioned marker gene can also perform sorting of target cells. This gene expression is Polymerase Chain Reaction (PCR). A method and Reverse Transcriptase It can carry out by (RT)-PCR method etc.

[0013]Although an PCR reaction can be performed in the field concerned by the publicly known method or the substantially same method as it, or the changing method, For example R. Saiki et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki et al., Science, 239: 487, 1988; M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988); H. A. Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press, 1989; M. A. Innis et al. (ed.), "PCR Protocols: A Guide. to. Methods and Applications", Academic. Press, New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991; D. M. Glover et al. (ed.), "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 (The Practical Approach.), Series, IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. (ed.), "PCR Applications: Protocols for Functional By the method or the substantially same method as them, and the changing method given in literature quoted a method Genomics" and given in Academic Press, New York (1999), etc., or there. It can carry out. (the statement in them is included in the indication of this specification by referring to it) . The PCR method can be performed using a commercial kit suitable for it, and can also be enforced according to the protocol clarified by the kit manufacturer or the kit vendor. Although a usually suitable primer is used in the PCR method, an oligonucleotide can be used as this primer.

[0014]An "oligonucleotide" is usually a polydeoxy nucleotide of the single strand or double strand of short length, and this is chemically compounded using publicly known methods (for example, solid phase art etc. which is indicated to EP 266,032). As such a method, a phosphotriester method, a phosphite method, a phosphorousaminodite method or Froehler et al., Nucl. Acids Res. 14, and a method that is indicated by 5399 (1986) are mentioned, for example. Subsequently, what was compounded chemically is refined on polyacrylamide gel.

[0015]The retinal nerve cell stock in which the passage of this invention is possible means the cell which was stock-sized with most functions held which a retinal nerve cell has and which can carry out a passage and can be maintained. As a retinal nerve cell stock in which the passage of this invention is possible, a retinal ganglion cell, an amacrine cell, a horizontal cell, a bipolar cell, visual cells, etc. are mentioned, for example. When obtaining from the eyeball of the temperature sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics mammalian which is also one mode of this invention, the cell strain turns into an immortalization retinal nerve cell stock, and can be held to stability. establishment of a transgenic animal -- JP,5-292958,A (the 2,988,753rd item gazette of a patent) etc. -- it can carry out. In one desirable mode of this invention, a stock-sized retina optic nerve cell and a stock-sized retinal ganglion cell can be established, respectively from the transgenic rat into which the large T antigen gene of the temperature-sensitive mutant of SV40, for example, SV40tsA58 DNA, was introduced. If it explains per establishment of a concrete stock-sized retina optic nerve cell, according to the statement of the above-mentioned 2,988,753rd item gazette of a patent, Take out the eyeball from the transgenic rat which introduced and created large T antigen gene SV40tsA58 of the temperature-sensitive mutant of SV40 as a start body tissue, and retina tissue is separated, It processes with enzymes, such as trypsin and collagenase, and after changing into the state where the cell was distributed, this cell suspension is cultivated.

[0016]As a culture medium used for culture, a publicly known thing or a commercial thing can be used suitably. The source of carbon utilization, the source of nitrogen utilization, etc. are

included in this culture medium. Mineral, amino acid, vitamins, sugars, a blood serum, hormone, a growth factor, an antibiotic, etc. are suitably blended with this culture medium. It changes this culture medium into the state where it was suitable for culture by buffer, an osmotic adjustment agent, etc. A cell culture is preferably performed under existence of an extracellular matrix. As this extracellular matrix, I – IV type collagen, fibronectin, a laminin, vitronectin, etc. are mentioned. The carrier etc. by which the coat was carried out can be conveniently used for a cell culture. As this carrier by which the coat was carried out, he is Polly L. – The container for culture of Daish etc. as whom it acted, such as a lysine coat, a collagen coat, a gelatin coat, and a fibronectin coat, is mentioned. The cultured cell is divided into each using a specific marker. For example, in the case of an optic nerve cell, it is possible to use rhodopsin as a marker, An anti-rhodopsin antibody is made to contact the cell suspension containing the target optic nerve cell first, Next, the column which fixed the ligand (it is an anti-mouse antibody of a rabbit if for example, this anti-rhodopsin antibody uses the mouse monoclonal antibody) specifically combined with the anti-rhodopsin antibody combined with the optic nerve cell is used, and an optic nerve cell can be separated selectively. If it dissociates from the retina origin cell of to some extent others, cloning can be performed by limiting dilution until it becomes a single clone. It is the same technique and a retinal ganglion cell, an amacrine cell, a horizontal cell, a bipolar cell, etc. can be obtained, for example.

[0017]These cell strains are applicable to production of various bioactive factors, a differentiation inducing factor, and a differential inhibition factor. Furthermore, it can be used also as a recombinant DNA cloning host and a gene donor. It is useful to creation of a retinal nerve cell specific marker, and creation of the antibody to it. Based on antibodies, such as a mouse to the acquired retinal nerve cell specific marker, acquiring with the usual gene manipulation art becomes possible also for a human antibody. This antibody is needed for separation of a retinal nerve cell, identification, a fixed quantity, etc. in the cases, such as a cell transplant. Among this specification, the term "antibody" may contain a single monoclonal antibody, the antibody constituent which has multi-epitope singularity, and antibody fragments (for example, Fv etc.), as long as it is especially used in the largest meaning and they show desired biological activity.

[0018]The term "monoclonal antibody" says the antibody substantially obtained from a homogeneous antibody group. That is, existing there also has [each antibody which constitutes the group] a little mutually same variants that may exist naturally except for a certain point. Singularity of a monoclonal antibody is high and it recognizes a single antigen part. As for the conventional antibody (polyclonal) preparation things that a different antibody to a typically different antigenic determinant (epitope) is included, each monoclonal antibody recognizes the single antigenic determinant on an antigen by contrast. In addition to those singularity, they are compounded with a hybridoma culture thing and the monoclonal antibody has an advantageous point about the point that other immunoglobulins are not mixed. it is said that the modifier "monoclonal" means that the feature of an antibody which is substantially obtained from the group of a homogeneous antibody is shown, and needs there production of the antibody by arbitrary specific methods --- as --- it should be interpreted --- it does not come out. For example, the monoclonal antibody used according to this invention, Kohler (Kohler) and Milstein (Milstein), . [whether it is producible by the hybridoma method first indicated by Nature(London) 256:495 (1975), and] Or it is producible by a recombinant DNA method (for example, refer to U.S. Pat. No. 4,816,567 (Cabilly et al.)).

[0019]The monoclonal antibody used by this invention, Clackson et al., Nature 352: 624–628 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol. 222 : The art of a statement is used for 581–597 (1991), It can be isolated also from the phage library of an antibody. As long as it shows desired biological activity, especially the monoclonal antibody in this specification, or [that some of heavy chains and/or light chains are the same as that of the corresponding arrangement in the antibody belonging to the specific seed origin, or the class or subclass of a specific antibody] -- or, even if it is homologous, Whether the remainder of a chain is the same as that of the corresponding arrangement in the antibody belonging to another seed origin, or the class or subclass of another antibody Or the "chimera" antibody which is homologous (immunoglobulin), And the

fragmentation of such an antibody may be included (U.S. Pat. No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, and 6851-6855 (1984)).

[0020]As a thing of "hominization" gestalt of a nonhuman antibody (for example, mouse antibody), It is a chimera immunoglobulin, an immunoglobulin chain, or its fragmentation (for example, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen junction sequences of an antibody), and they include the minimum arrangement of nonhuman immunoglobulin origin. In most cases, a hominization antibody is a recipient's complementarity determining region. (complementarity-determining region; CDR) Residue Mouse, It is a rat or a nonhuman animal (donor antibody) like a rabbit, and is the human immunoglobulin (recipient antibody) replaced by the residue originating in desired singularity, compatibility, and CDR that has capability. In some cases, Fv framework residue of a human immunoglobulin is replaced by corresponding nonhuman residue. A hominization antibody may contain the residue which is not found out in any of a recipient antibody and introduced CDR, or framework arrangement. These changes are performed in order to make [the further outstanding thing or] performance of an antibody the optimal. Generally, a hominization antibody corresponds to at least one, and all the substantial CDR fields of all [or] are typically equivalent to the CDR field of a nonhuman immunoglobulin here including substantial all of two variable domains. Furthermore. In detail Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); EP-B-239400; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992); And EP-B-451216 can be referred to.

[0021]The cell strain of this invention can be used for a retina transplant and gene therapy. This cell strain is applicable to research of differentiation of a retinal cell, etc. If you can understand structure, such as the differentiation, now and it is lengthened with a molecular level using the cell strain obtained by this invention, the factor which has a various function is obtained. As for the use as drugs, these factors are considered. In addition, it can use for production of the new cytokine which this cell strain itself produces, its cloning, etc., and can be used for the pharmacological test of various substances, a toxicity test, etc. Especially the stock-sized visual cells of this invention are useful to screening of the agonist thing to ophthalmology illnesses, such as age-related macular degeneration and retinitis pigmentosa, etc. The stock-sized retinal ganglion cell of this invention is useful to screening of the agonist thing to ophthalmology illnesses, such as ischemic diseases of eyes, such as glaucoma and central artery obstruction, etc. The stock-sized amacrine cell of this invention is useful to screening of the agonist thing to ophthalmology illnesses, such as ischemic diseases of eyes, such as diabetic retinopathy and central artery obstruction, etc.

[0022]If the neural cell line of the retina origin in which passage maintenance of this invention is possible is used, the screening method of a compound for identifying the compound which promotes or (or enhancement) checks the functional activity or operations of an object neural cell line (for example, biological activity or an operation etc.) (or control) is provided. For example, on a cell within a retinal nerve cell, Some specific protein bond molecules (for example, the ligand to a receptor, an enzyme substrate molecule, etc.), and this object protein (for example, a receptor, an enzyme, etc.) In order to identify the compound which checks the compound or this interaction which promotes an interaction (or enhancement) (or control), The screening method of a compound is also provided. The this compound (agonist) to promote is a compound which promotes the natural biological functions of object (purpose) protein (or enhancement), and the compound (antagonist) this checked on the other hand is a compound which checks the compound or this function to make such a function fall (or control). The preparation thing obtained from the neural cell line and this cell of the retina origin in which passage maintenance of this invention is possible. (For example, cell fraction, for example, film, vacuole, and inclusion body (inclusion) or those arbitrary preparation things) etc. under existence of the candidate molecule which can grow into the object protein agonist concerned or antagonist, or under absent, It incubates with the labeling thing for detection if needed. A candidate molecule is this object protein (for example, a receptor, an enzyme, etc.). What does not induce an operation which affects it to this object protein to combination of this protein bond molecule even if it joins together will become the best antagonist. It is the agonist which a candidate molecule combines with this object protein, and, on the other hand, pulls out the same

effect as this protein bond molecule, or the dramatically related effect. Although the neural cell line of the retina origin which was obtained according to this invention and in which typical passage maintenance is possible, for example, the neural cell line of the retina origin in which passage maintenance of a rat is possible, has proliferation potential by large T gene expression and passage maintenance is possible for it under a 33 ** culture condition, Under a 37 ** culture condition, disappearance of large T gene expression occurs and it has the description of resulting in the cell death by apoptosis gradually. The protective action of bioactive factors, such as a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to the cell death which uses the neural cell line of the retina origin in which passage maintenance of this rat is possible, and is derived by the bottom of the culture condition of (1) 37 **, (2) It is possible to perform a mechanism break through etc. of the protective action of bioactive factors, such as BDNF to the cell death caused with hypoxia load and glutamic acid, and it is useful.

[0023]In this specification, a term "cell (cell)", "cell strain (cell line)", and "the cell culture thing (cell culture)" of each other are used exchangeable, and such all the names contain the posterity. It will be understood by the variation in which all the posterity is on purpose or accidental that it may not be correctly the same about a DNA inclusion. There, the variant posterity who has the same function or biochemical character as having screened in the established original established cell line is contained. In the measuring method of this invention, when applying each immunoassay, setting out in particular of special conditions, operation, etc. is not usually needed there. What is necessary is to add a person's skilled in the art usual technical consideration to the usual conditions in each method, and operation information, and just to build the system of measurement relevant to the substance which has activity substantially equivalent to the target substance concerned or it of this invention.

[0024]About the details of these general arts means, can refer to a total theory, a compendium, etc. and for example, Inlet *****, "radioimmunoassay", Kodansha, Showa 49 issue; inlet The volumes for *****, "** radioimmunoassay", Kodansha, and Showa 54 issue; Eiji Ishikawa, "enzyme immunoassay", Igaku-Shoin, Showa 53 issue; [Volumes for Eiji Ishikawa "enzyme immunoassay" (the 2nd edition),] Igaku-Shoin, Showa 57 issue; Volumes for Eiji Ishikawa, "enzyme immunoassay" (the 3rd edition), Igaku-Shoin, Showa 62 issue; H. V. Yunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B) Academic Press and New York; (1981) J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunoch.) emical. Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Part E: Immunochemical Techniques, Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York; (1990) J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular.) Designand. Modeling.. Concepts and Applications, Part B: Anibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), By the method or the substantially same method as them, and the changing method given in literature quoted by Academic Press, New York (1991), etc. the method of a statement, or there. It can carry out. (the statement in them is included in the indication of this specification by referring to it) .

[0025]In the DNA-cloning art used in this invention, The concrete operation, processing condition, etc., for example J. Sambrook and E. F. Fritsch & T. Maniatis (ed.), " -- Molecular Cloning: . A . Laboratory. Manual(2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al.(ed.), "DNA Cloning", 2nd ed., and Vol. 1 to 4 (The Practical Approach Series), By the method or the substantially same method as them, and the changing method given in literature quoted by IRL Press, Oxford University Press (1995), etc. the method of a statement, or there. It can carry out (the statement in them is included in the

indication of this specification by referring to it). . Concrete operation, processing conditions, etc., such as a cell culture, For example WilliamB. Jakoby et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 58 (Cell Culture), Academic Press, New York (1991) and others. Methods. in . Enzymology series (Vol.1-317), Academic Press, New York; Jennie P. Mather et al. (ed.), "Methods in Cell Biology", Vol.57 (.) Animal Cell Culture Methods, By the method or the substantially same method as them, and the changing method given in literature quoted by Academic Press, New York (1991), etc. the method of a statement, or there. It can carry out. (the statement in them is included in the indication of this specification by referring to it) .

[0026]

[Example]Although an example is hung up over below and this invention is explained concretely, this example is only provided for reference of that concrete mode for explanation of this invention. Although it is for these illustration explaining the specific concrete mode of this invention, it does not mean limiting the scope of the invention indicated by this application, or restricting. In this invention, it should be understood that various embodiments based on the thought of this specification are possible. All the examples are the thing carried out using standard art, or a thing which can be carried out except what is otherwise indicated in detail. This is idiomatic for a person skilled in the art at common knowledge.

The main cable addresses used in the following example: BSA: bovine serum albuminEBSS: Earle's balanced salt solutionSV40: simian virus 40NPBM: Neural Progenitor Basal MediumEDTA:ethylenediaminetetraacetic acidPBS: phosphate-buffered saline [0027]Example 1(i) Transgenic rat of six to 10 age in day which introduced large T antigen gene SV40tsA58 of the temperature-sensitive mutant of separation SV40 of the retina composition cell from an animal tissue (the Wyeth NYU technology research institute twist acquisition;) (F1) Two animals JP,5-292958,A (the 2,988,753rd item gazette of a patent) The eyeball was extracted from having been obtained by the technique of the statement, and it used for separation of a retinal nerve cell. Along with the equatorial part, half-segmented [of the extracted eyeball] was carried out under ice-cooling, and it removed a cornea, the iris, and a ciliary body. The nerve net film exfoliated from the choroid and were collected into EBSS. The retina was processed for 30 minutes at 37 ** with 15 U/ml papain (made by a sigma company), bovine serum albumin (BSA, 2 mg/ml, sigma company make), Dnase I (10 kU/ml, sigma company make), and ovomucoid (4mg [ml] /, Boehringer Mannheim make) were added, and the cell was suspended using a 1-ml pipette. Centrifugality of this cell suspension was carried out for 5 minutes by 1000xg, and cells were collected. The cell was suspended by the culture medium and performed suspended cell culture for one to three days with the dish which carried out the coat of the agarose 1% (Drawing 1). . It cultivated with the dish of the poly-D-lysine coat after the suspended cell culture for one to three days (Drawing 2). . It cultivated at 33 ** among incubation period using the NPBM culture medium (Neural Progenitor Basal Medium and Clonetics) which contains fetal calf serum 10% as a culture medium. About the gene expression of these cells, it investigated by the RT-PCR assay (Drawing 3).

[0028](ii) cloning of the cloning cell of a cell --- 1. --- three, the concentration and 2. colony formation assay using a specific antibody, and 3. limiting dilution, were used.

(a) Since the cloning visual cells of visual cells had revealed rhodopsin, they condensed visual cells using the rhodopsin antibody (Ishiguro et al, J.B.C., 266 (23), 15520-4, 1991). the retinal cell cultured on the dish of 35 mm poly-D-lysine coat --- a CTC solution (collagenase and 100u/ml.) Using trypsin, 0.1%, a fowl blood serum, 2%, EDTA, and 4mM, it exfoliated from the dish, centrifugality of the cell was carried out for 5 minutes by 1000xg, and cells were collected. It was suspended to PBS-BSA which washes a cell by PBS (PBS-BSA) containing BSA (0.5 %, sigma company), and contains a rhodopsin antibody continuously. It incubated for 10 minutes at 4 **. After washing a cell by PBS-BSA twice, 4 ** incubated for 15 minutes by PBS-BSA containing microbeads-conjugatedanti-rabbit IgG. After washing a cell twice, it was suspended to PBS-BSA and the rhodopsin antibody-positive cell was separated using mini-MACS separation column (the first chemicals). This cell was cultured until the 100 ***** colony was formed in a 100-mm dish. When the colony was formed, the cloning cup was placed so that a colony might be surrounded, and the cell was removed from the dish using the CTC solution. When scattering this

cell to the dish of 35 mm poly-D-lysine coat and beginning growth, it removed from the dish, and the cell was scattered so that it might become 1–10 per 1 well at 96well plate. The cell increased from this plate was dyed by the rhodopsin antibody, and it checked that they were visual cells.

[0029](b) It carried out like [cloning / of other cells other than the cloning visual cells of other cells] visual cells. As for Thy 1.1 and an amacrine cell, in the ganglion cell, microtuble-associated protein 2 (MAP-2) and a bipolar cell have revealed calbindin D28 specifically. Therefore, like visual cells, the cell was condensed using each antibody and cloning of the cell was carried out by a colony formation assay and limiting dilution. As an antibody used, for example, The following :Mouse anti-Thy1.1 monoclonal antibody:clone OX-7, Chemicon International Inc, CA, USA,Lake, et al., Eur.J. Immunol mentioned . 9 : 875–886;(1979) Mouse. anti-Microtuble associated. protein-2 monoclonal. antibody:clone. 5F9, Upstate biotechnology, NY, USA,Shelanski, et al., PNAS, 70: 765–768 (1973);Mouse anti-Calbindin D28 monoclonal antibody : clone CL-300, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA;Rabbit anti-Rhodopsin polyclonal antibody:Ishiguro et al, J.B.C., 266(23), 15520–4, 1991 [0030](iii) The characteristic (1) of an established cell line Gene expression specific to visual cells, such as opsin, a transducin, an S antigen, and HOSUDEYUSHIN, is known for visual cell visual cells. About such gene expression, when investigated by the RT-PCR assay, all the gene expression was checked (Drawing 4). Although it was known in in the living body that the expression amounts of a transducin are about 1/10 of opsin, also in the visual cells which carried out cloning this time, it turned out that the expression amounts of a transducin are about 1/10 of opsin like in the living body. When immunohistochemistry was performed using the rhodopsin antibody, all the cells were rhodopsin antibody-positive (Drawing 5). It is known that the visual cells of the retina will denaturalize with various diseases. There are age-related macular degeneration accompanying the retinitis pigmentosa and aging which are hereditary diseases, etc. To these visual cell denaturation, research is done widely and the animal accompanied by visual cell denaturation is used for heredity as an experimental model in many cases. These animals are already used and it is known that many nutritional factors will work protective to visual cell denaturation. It investigated about whether these factors work protective in the cell death of visual cells which carried out cloning this time. Since it died by blood serum removal as well as the visual cells which carried out cloning this time, and many nerve cells, it investigated about the protective effect over the cell death by blood serum removal. As opposed to the survival rate of tsSV40p-1 having been about 7 % by blood serum removal of 24 hours, Cell death was controlled by the concentration dependence target in tsSV40p-1 which added the basic fibroblast growth factor (bFGF), the ciliary neurotrophic factor (CNTF), and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the culture medium (Drawing 6) .

[0031](2) It is known for the ganglion cell ganglion cell that Thy 1.1 antigen is revealed. The manifestation was checked when investigated by the RT-PCR assay about this gene expression. (3) It is known for the amacrine cell amacrine cell that microtuble-associated protein 2 (MAP-2) is revealed. The manifestation was checked when investigated by the RT-PCR assay about this gene expression. It is checked that the above-mentioned retinal nerve cell stock obtained by this invention has the gene expression which described above after the passage of his 30's. By this invention, it is judged as a stock-ized retinal nerve cell in this way that a ganglion cell, an amacrine cell, visual cells, and a horizontal cell are obtained. As a primer suitable for being used for above-mentioned PCR in an example, for example, :Thy1,15'-

TGCCGTATGAGAATAACACC-3'5'-TTATGCCACCACACTTGACC-3'Microtuble associated protein-2 to which the following are mentioned (MAP-2) 5' -CCTGCAGTGGAGAAGATTCC-3'5'-CTGTCATCAGCAACAGGTGG-3'Opsin5 -- 'AGTGACAGGATGGTCCTTGG-3'5'-TGAGAGTCCTCAGCAACTGG-3'. Phosducin5'-ATGAGCATTCAAGAATATGAA-3'5'-CAGCTCATACACAAACCCATA-3' Transducin5'-CTAACATTCAGTATGGAG-3'5'-TGAGTCTCGATAATACCAG-3' S. - antigen5'-TTCAGTGATGTTGCAGCCAGC-3 -- '5'-GTGTTCCCTCCGAGGCTACAG-3'5'-GTCAAAGTGTGCTTGGCTGC-3'phosphodiesterase5'-GTGTCATATGGAAC. GTGTGG-3'5' – GTAGTCGGTGAGCTCATCGG. -According to 3' this invention, the retinal cell stock of a rat can be obtained, and thereby, it becomes possible to use

advantageously art including the data obtained and stored by the rat, and provide the arts means outstanding in research of an ophthalmologic field until now. In the research and development about the neuroprotective action pointed out especially above, the mainstream of research uses a rat and the arts means which attracts attention also at this point is provided. In the in vitro experiment system of primary culture, the effect is bad (in practice, even if it carries out distributed culture of the cell from many animals), maintenance looks at the reaction of a drug [as opposed to / it is difficult and / specific cells] -- almost -- it cannot do -- it becomes possible to be markedly alike and to raise efficiency by this invention, to this, and the passage maintainable cell strain suitable for drug screening use is provided.

[0032]

[Effect of the Invention] It became possible to carry out isolation culture of the retina and to obtain the retinal nerve cell in which passage maintenance is possible from a temperature-sensitive mutant SV40 large T antigen transgenics rat, by this invention. As a cell in which passage maintenance is possible, a retinal ganglion cell, an amacrine cell, a horizontal cell, and visual cells can be established. It can use for development of the drug which has a neuroprotective action to various retina diseases using the retinal nerve cell in which this passage maintenance is possible. An immortal cell is used, it becomes possible to do research concerning a retinal nerve cell by a culture system, and it becomes possible to develop useful drugs, such as a neuroprotective agent, efficiently. It is clear that this invention's [especially] it can perform also except having indicated in the above-mentioned explanation and the example. In view of above-mentioned instruction, many changes and modification of this invention are possible, therefore they are also the things of the claim of this attachment within the limits.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The photograph which shows the gestalt of the cell after carrying out suspended cell culture of the retinal cell obtained from the transgenic rat for after-separation three days.

[Drawing 2] The photograph which shows the gestalt of the retinal cell obtained from the transgenic rat after cultivating with the dish of a poly-D-lysine coat.

[Drawing 3] The photograph of the electrophoresis which shows the result of having investigated gene expression by the RT-PCR assay, about the culture retinal cell obtained from the transgenic rat.

[Drawing 4] The photograph of the electrophoresis which shows the result investigated by the RT-PCR assay about the opsin in stock-sized visual cells, a transducin, an S antigen, and HOSUDEYUSHIN gene expression.

[Drawing 5] The photograph which shows the result of the immunohistochemistry examination using the rhodopsin antibody in stock-sized visual cells.

[Drawing 6] The result of the protective effect examination to the cell death by the blood serum removal which uses stock-sized visual cells is shown. basic fibroblast growth factor (bFGF); --

ciliary neurotrophic factor (CNTF); -- a brain-derived neurotrophic factor

[Translation done.]

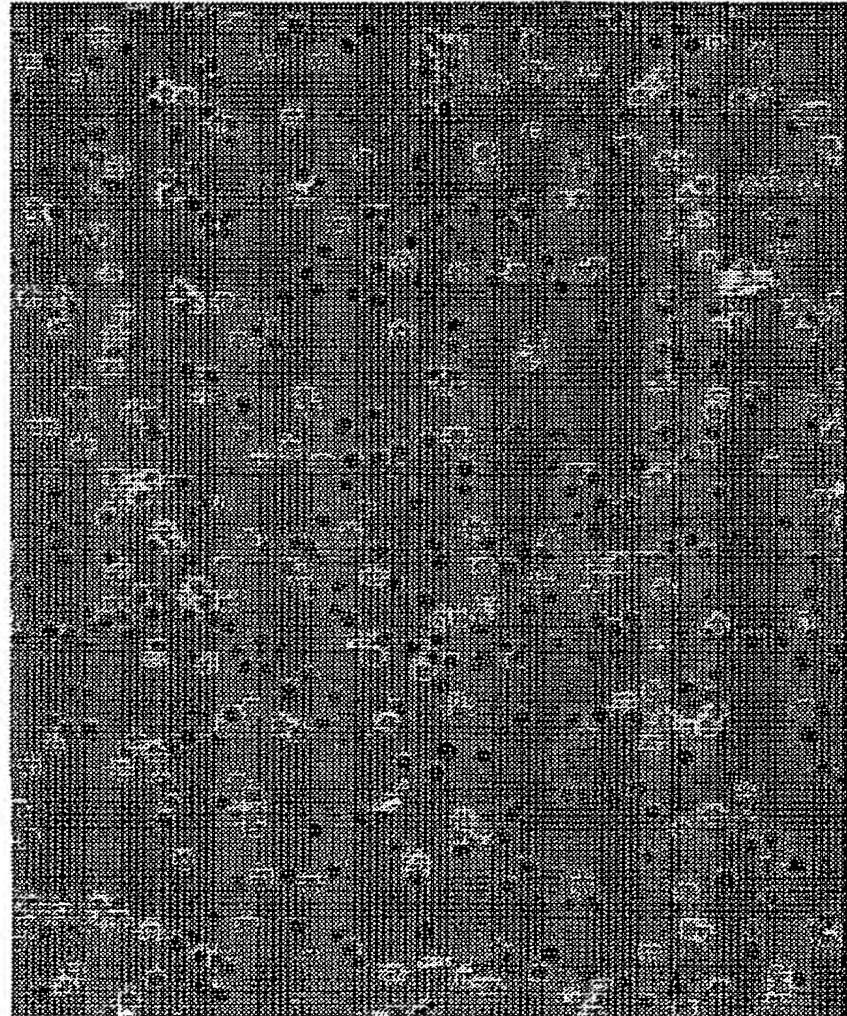
* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]



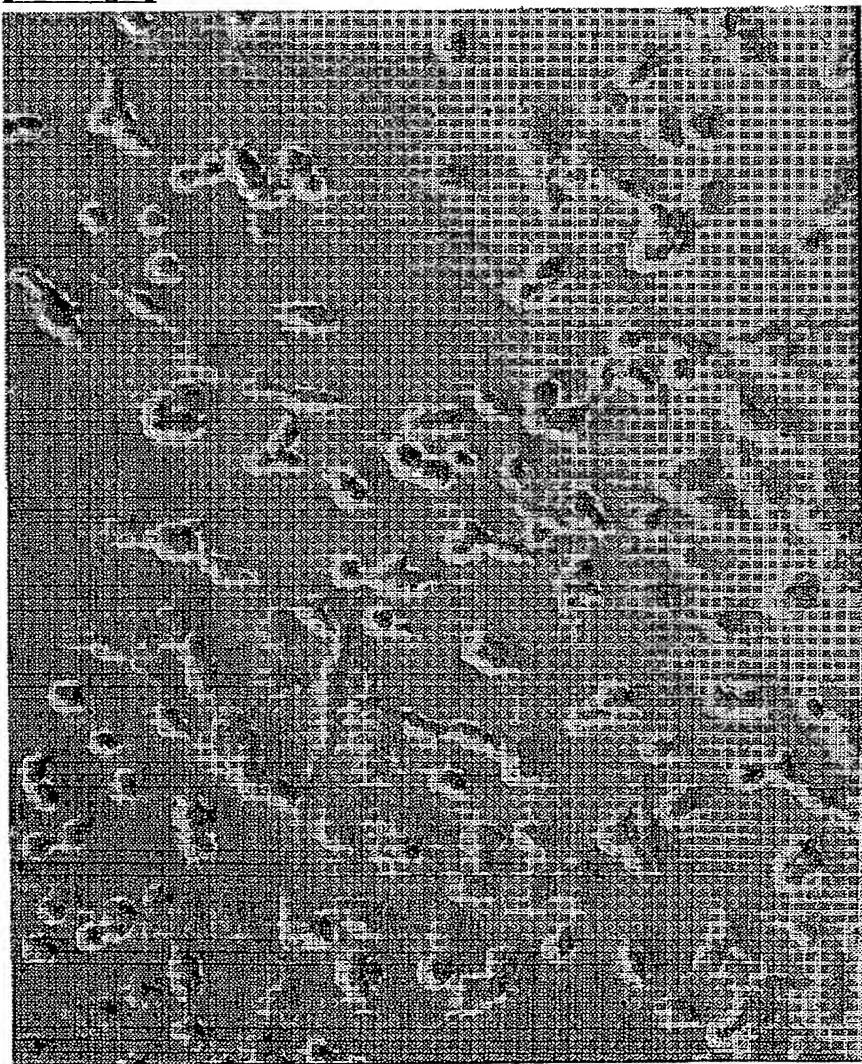
[Drawing 4]

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1. negative control
2. B-actin
3. phosducin
4. S-antigen
5. S-antigen
6. transducin
7. phosphodiesterase
8. opsin
9. 100bp laddar marker

[Drawing 2]



[Drawing 3]

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

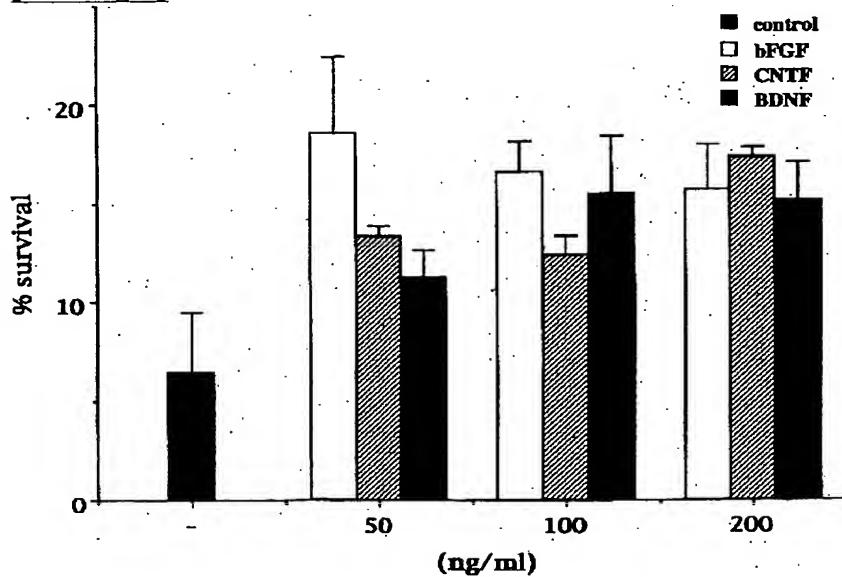


14 15 16



1. trkA	9. Thy1,1
2. trkB	10. MAP2
3. trkBt	11. NR1
4. p75	12. tsA58-1
5. NGF	13. β -actin
6. BDNF	14. Transducin
7. iNOS	15. PDE
8. TNF	16. opsin

[Drawing 6]



[Drawing 5]



[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002-112764
(P2002-112764A)

(43)公開日 平成14年4月16日 (2002.4.16)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク一(参考)
C 1 2 N	5/10	C 1 2 Q	1/02 2 G 0 4 5
	15/09		1/68 A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15 Z 4 B 0 6 3
	1/68		33/50 X 4 B 0 6 5
G 0 1 N	33/15		Z 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数19 O.L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-305728(P2000-305728)

(22)出願日 平成12年10月5日 (2000.10.5)

(71)出願人 899000035

株式会社 東北テクノアーチ
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉468番地

(72)発明者 玉井 信
宮城県仙台市太白区八木山本町2丁目22番
18号

(72)発明者 富田 浩史
宮城県仙台市青葉区中山5丁目18番1-
301号

(74)代理人 100098729
弁理士 重信 和男 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 株化網膜神経細胞

(57)【要約】

【課題】 網膜の疾患に対する有用な薬物の開発に利用可能な網膜神経細胞株を提供する。

【解決手段】 温度感受性変異株SV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物、特に好ましくはトランスジェニックラットから、継代維持可能で且つ網膜由来の神経細胞株、例えば網膜神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞、視細胞などを樹立できる。得られた株化網膜由来の神経細胞は、眼科疾患作用薬物（加齢黄斑変性症、網膜色素変性症、緑内障、糖尿病性網膜症などに対する医薬）のスクリーニングなどに有用である。

記載の方法。

【請求項16】 試料中の網膜の神経細胞に対する生物活性の測定法であって、(i) 繙代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を使用し、(ii) (a) 試料存在条件下で維持した上記(i)の細胞と、(b) 試料の存在しない条件下で維持した上記(i)の細胞とを比較することを特徴とする、該測定法。

【請求項17】 網膜の神経細胞に対する生物活性を有する化合物の同定方法であって、(i) (a) 繙代維持可能

10 で且つ網膜由來の神経細胞株を、該網膜由來の神経細胞株を維持可能な条件下で、試料化合物と接触させる場合と、(b) 該網膜由來の神経細胞株を維持可能な条件下で、繙代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を該試料化合物の存在しない条件下に保持する場合とを比較するか、あるいは(ii) (a) 繙代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を、試料化合物と、網膜の神経細胞の機能を低下せしめる条件下で接触させる場合と、(b) 繙代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を、該試料化合物の存在しないで且つ網膜の神経細胞の機能を低下せしめる条件下で保持する場合とを比較し、該試料化合物が網膜の神経細胞に対する生物活性を有するか否かを測定することからなる同定方法。

【請求項18】 網膜の神経細胞に対する生物活性を有する化合物が、網膜の神経細胞に発現する受容体に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする、請求項17記載の方法。

【請求項19】 請求項9～15のいずれか一記載の温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の眼球を用いることを特徴とする、網膜由來の繙代維持可能な神経細胞株を得る方法。

30 【請求項10】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の眼球から分離された神経網膜を用いることを特徴とする、請求項9記載の方法。

【請求項11】 温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の網膜を用い、網膜の神経細胞に特異的なマーカーを利用して選別クローニングを行うことを特徴とする、網膜由來の繙代維持可能な神経細胞株の樹立方法。

【請求項12】 マーカーとして、ロドプシンを使用し、抗ロドプシン抗体を用いて視細胞を選別し、株化視細胞を得ることを特徴とする、請求項11記載の方法。

【請求項13】 マーカーとして、Thy 1.1 抗原を使用し、抗Thy 1.1 抗原抗体を用いて神経節細胞を選別し、株化神経節細胞を得ることを特徴とする、請求項11記載の方法。

【請求項14】 マーカーとして、microtubule-associated protein 2 を使用し、抗microtubule-associated protein 2 抗体を用いてアマクリン細胞を選別し、株化アマクリン細胞を得ることを特徴とする、請求項11記載の方法。

【請求項15】 マーカーとして、calbindin D28 を使用し、抗calbindin D28抗体を用いて水平細胞を選別し、株化水平細胞を得ることを特徴とする、請求項11記載の方法。

30 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、眼の網膜に存在する神経細胞であって、繙代培養可能な細胞（特にラット由來細胞）に関する。本発明は、特に、眼の網膜に存在する神経細胞の株化された細胞（特に、ラット由來細胞）、該細胞を用いた眼科疾病（加齢黄斑変性症、網膜色素変性症、緑内障、糖尿病性網膜症など）作用薬物のスクリーニングや、眼の網膜などでその副作用が問題となる薬物のスクリーニングをするのに利用可能な細胞株に関するものである。また、眼の網膜に存在する神経細胞に発現する種々の受容体を標的とした薬物（加齢黄斑変性症薬、網膜色素変性症薬、緑内障薬、糖尿病性網膜症薬など）のスクリーニングを行うのに利用可能な細胞株に関するものである。さらに、眼の網膜に存在する神経細胞の障害（加齢黄斑変性症、網膜色素変性症、緑内障、糖尿病性網膜症など）を標的とした薬物のスクリーニングをするのに利用可能な細胞株に関するものである。

【0002】

【従来の技術】網膜は外界からの光の刺激を脳へ伝達する機能を有する組織であって、外界に直接接している脳組織の一部であると考えられている。そして、網膜は高度に分化した機能を持ち、眼内の他の硝子体などの組織とも異なることが認められるものである。網膜には、神経細胞として神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞、双極細胞、視細胞が、そしてグリア細胞としてミューラー細胞、アストロサイトが存在することが知られている。こうした網膜は、それに対する傷害が致命的な結果をもたらすことから、臨床的にはバイオプシーを行うなどして病態の把握を行うことはできないものであるし、生体内では非常に小さい組織であることから、その異常を血液検査などの全身的な検査からは得ることができないなどという特殊性を持った組織である。この網膜における疾患として有名なものには緑内障が挙げられる。現在、日本における40才以上の緑内障有病率は3.5%とされ、高齢化に伴いこの緑内障有病率はさらに増加し、我が国の人団からすると緑内障患者は約200万人にのぼると推定される。病型別にみた場合、注目されるのは原発開放隅角緑内障(POAG)に対し、正常眼圧緑内障(NTG)が3倍以上の頻度で存在し、日本人の場合は全緑内障患者の約70%を占めることである。緑内障の原因として、従来は高眼圧が主原因とされ、その治療としては対症的に眼圧下降に主眼がおかれ、眼圧降下剤、房水濾過手術が行われていた。

しかし近年、網膜神経細胞死にアポトーシスという特定の細胞死が存在することが示され、実験的緑内障で典型的なアポトーシス所見を示すことが報告されている。NTGにおいて、その臨床像からアポトーシスによる細胞死が深く関与していると予想される。こうした流れからNTGにおいては、従来の眼圧下降治療だけでなく、「神経防衛」治療の開発、確立が急がれている。

また、緑内障に限らず、第1表に示した疾患では主として障害される神経細胞が同定されており、継代維持可能な網膜神経細胞の樹立はこれらの疾患に対する治療薬の開発を飛躍的に向上させるものと考えられる。

【0003】

【表1】

下記に網膜疾患で主に障害される神経細胞を示す。

網膜疾患名	主に障害される神経細胞
緑内障	神経節細胞
糖尿病性網膜症	アマクリン細胞
中心動脈閉塞症など 虚血性疾患	神経節細胞 アマクリン細胞
加齢黄斑変性症、 網膜色素変性症	視細胞

【0004】しかしながら、網膜神経細胞は培養条件下では継代はもちろんのこと、維持さえも困難であること

から、神経保護作用を有する薬物の研究開発には多くの場合、動物実験モデルにより行われてきた。実際、1つの薬物の保護作用を検討するためには、多数の動物、特に最低でも20匹以上のラットが使用されてきた（なお、マウスでは眼球が小さすぎて、手術操作が極めて困難であったり、薬物の効果判定などにおける観察が困難であるなどのことから、眼科領域では、ラット又はウサギが実験に多く用いられてきた）。しかし、動物をそのまま使用する手法では限界がある。ところで、従来の株化細胞樹立法としては、1) 初代培養細胞を長期間培養し続けて、無限増殖能を獲得した細胞を得る方法、2) SV40などの癌遺伝子を初代培養細胞に導入して不死化させる方法などが挙げられる。しかしながら、1)の方法では時間がかかるにもかかわらず目的の細胞が必ずしも得られるとは限らない。また、2)の方法では遺伝子導入が増殖性の細胞のみに起こること、また個々の細胞で染色体導入位置の相違があるなどの欠点がある。したがって、生体組織毎に異なり、そして各組織に特異な形質あるいは機能を発現している細胞をその性質などを損なうことなく該形質あるいは機能を発現している不死化細胞株として得ることは困難である。

【0005】これら従来の株化細胞樹立法の問題点を克服する方法として、SV40などの癌遺伝子を導入したトランスジェニックマウスから目的の組織の細胞を単離し、株化細胞を得る方法が開発された [Yanai N. et al., *Exp. Cell. Res.*, 197, 50-56 (1991); Yanai N. et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 1344-1348 (1991)]。該方法は、最初から不死化に必要な癌遺伝子が細胞に組み込まれているので、分化形質を保持したままの株化細胞をかなり高頻度で樹立することができると期待されている。しかしながら、実際は、継代維持ができる一方で、各生体組織に特有の形質・機能を保持している細胞を株化することは容易でない。特に、網膜に存在する細胞は、その特殊性から、その継代維持ができる株化細胞の樹立が強く要望されていたにも拘らず、それにはこれまで成功していなかった。また、網膜組織の研究には、ラット組織を使用する必要があるが、トランスジェニックラットの作出は容易でないという事情もある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】眼科疾患、例えば加齢黄斑変性症、網膜色素変性症、緑内障、糖尿病性網膜症などに対する薬物の開発研究、網膜に存在する神経細胞に発現する種々の受容体を標的とした薬物、例えば加齢黄斑変性症治療薬、網膜色素変性症治療薬、緑内障治療薬、糖尿病性網膜症治療薬などの治療薬の開発研究、網膜に存在する神経細胞に生ずる障害あるいは異常の研究、さらにはこうした障害あるいは異常に対して作用する薬物の開発研究に利用したり、該薬物のスクリーニングなどに利用可能な眼の網膜に存在する神経細胞であつて、継代培養可能なラット由来細胞を樹立し、提供する

ことに関する。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、継代維持可能な網膜神経細胞を確立すべく、広範な研究並びに探索を行い、その結果、温度感受性変異株SV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物、特に好ましくは温度感受性変異株SV40ラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニッククラットを使用すれば、継代維持可能な網膜神経細胞を得ることが可能であることを見出して本発明に至った。すなわち、本発明は、継代維持可能な網膜神経細胞に関する。本発明は、また、温度感受性変異株SV40ラージT抗原遺伝子導入のトランスジェニック動物由來の網膜神経細胞、より好ましくは温度感受性変異株SV40ラージT抗原遺伝子導入のトランスジェニッククラット由來の網膜神経細胞に関する。本発明は、該継代維持可能な網膜神経細胞を使用した、種々の網膜疾患に対する神経保護作用を有する薬物の開発及びスクリーニングにも関する。本発明は、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子、例えばSV40tsA58を導入したトランスジェニック動物由來である株化網膜神経細胞であって、次の細胞：神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞及び視細胞から成る群から選ばれたものに関する。特に、本発明は、SV40tsA58遺伝子を導入したトランスジェニッククラット由來である株化網膜神経細胞であって、次の細胞：神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞及び視細胞から成る群から選ばれたものに関する。

【0008】〔1〕継代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株；

〔2〕該神経細胞株が、網膜神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞及び視細胞から成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔1〕記載の細胞株；

〔3〕神経細胞株が、オプシン、トランスデューション、S抗原、ホスデューション及びロドプシンから成る群から選ばれた遺伝子を発現している株化視細胞であることを特徴とする上記〔1〕又は〔2〕記載の細胞株；

〔4〕神経細胞株が、Thy 1.1抗原遺伝子を発現している株化網膜神経節細胞であることを特徴とする上記〔1〕又は〔2〕記載の細胞株；

〔5〕神経細胞株が、microtuble-associated protein 2遺伝子を発現している株化アマクリン細胞であることを特徴とする上記〔1〕又は〔2〕記載の細胞株；

〔6〕神経細胞株が、calbindin D28遺伝子を発現している株化水平細胞であることを特徴とする上記〔1〕又は〔2〕記載の細胞株。

〔7〕遺伝子の発現が、RT-PCR法により測定されたものであることを特徴とする上記〔3〕～〔6〕のいずれか一記載の細胞株；

〔8〕ラット由來のものであることを特徴とする上記〔1〕～〔7〕のいずれか一記載の細胞株；

【0009】〔9〕温度感受性突然変異SV40ラージT

抗原遺伝子導入哺乳動物の眼球を用いることを特徴とする、網膜由來の継代維持可能な神経細胞株を得る方法；

〔10〕温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の眼球から分離された神経網膜を用いることを特徴とする、上記〔9〕記載の方法；

〔11〕温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の網膜を用い、網膜の神経細胞に特異的なマーカーを利用して選別クローニングを行うことを特徴とする、網膜由來の継代維持可能な神経細胞株の樹立方法；

〔12〕マーカーが、オプシン、トランスデューション、S抗原、ホスデューション及びロドプシンから成る群から選ばれたものであることを特徴とする、上記〔1〕記載の方法；

〔13〕マーカーとして、ロドプシンを使用し、抗ロドプシン抗体を用いて視細胞を選別し、株化視細胞を得ることを特徴とする、上記〔11〕記載の方法；

〔14〕マーカーとして、Thy 1.1抗原を使用し、抗Thy 1.1抗原抗体を用いて神経節細胞を選別し、株化神経節細胞を得ることを特徴とする、上記〔11〕記載の方法；

〔15〕マーカーとして、microtuble-associated protein 2を使用し、抗microtuble-associated protein 2抗体を用いてアマクリン細胞を選別し、株化アマクリン細胞を得ることを特徴とする、上記〔11〕記載の方法；

〔16〕マーカーとして、calbindin D28を使用し、抗calbindin D28抗体を用いて水平細胞を選別し、株化水平細胞を得ることを特徴とする、上記〔11〕記載の方法；

〔0010〕〔17〕試料中の網膜の神経細胞に対する生物活性の測定法であって、(i) 継代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を使用し、(ii) (a) 試料存在条件下で維持した上記(i)の細胞と、(b) 試料の存在しない条件下で維持した上記(i)の細胞とを比較することを特徴とする、該測定法；

〔18〕網膜の神経細胞に対する生物活性を有する化合物の同定方法であって、(i) (a) 継代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を、該網膜由來の神経細胞株を維持可能な条件下で、試料化合物と接触させる場合と、

(b) 該網膜由來の神経細胞株を維持可能な条件下で、継代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を該試料化合物の存在しない条件下に保持する場合とを比較するか、あるいは(ii) (a) 継代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を、試料化合物と、網膜の神経細胞の機能を低下せしめる条件下で接触させる場合と、(b) 継代維持可能で且つ網膜由來の神経細胞株を、該試料化合物の存在しないで且つ網膜の神経細胞の機能を低下せしめる条件下で保持する場合とを比較し、該試料化合物が網膜の神経細胞に対する生物活性を有するか否かを測定することからな

る同定方法；

〔19〕 網膜の神経細胞に対する生物活性を有する化合物が、網膜の神経細胞に発現する受容体に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする、上記〔18〕記載の方法；

〔20〕 上記〔18〕記載の方法で同定される新規な化合物であり且つ網膜の神経細胞に対する生物活性を有する化合物であることを特徴とする、網膜の神経細胞に発現する受容体に対するアゴニスト又はアンタゴニスト；及び

〔21〕 上記〔9〕～〔16〕のいずれか一記載の継代維持可能で且つ網膜由来の神経細胞株が、温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物、特に温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入ラットから得られたものであることを特徴とする方法あるいは上記〔17〕～〔19〕のいずれか一記載の網膜由来の神経細胞株がラット由来である方法を提供する。

【0011】本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の株化細胞の樹立方法としては、癌遺伝子を導入したトランスジェニック動物から目的の組織の細胞を単離し、培養して株化細胞を樹立する方法が挙げられる。導入する癌遺伝子としては、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子、例えばSV40 tsA58などが挙げられる。トランスジェニック動物としては、トランスジェニックラットなどが挙げられる。組織は、網膜神経細胞を入手するに適し且つ摘出に適したものであればいかなる組織でもよいが、通常は眼球組織、特に眼の網膜などが挙げられる。上述のトランスジェニック動物より組織を摘出し、細胞を酵素法〔(Ichiikawa N. et al., J. Pharmacol. Toxicol. Method. 36: 45-52 (1996); Goldstein G. W. et al., J. Neurochem. 25: 715-717 (1975); Meyer J. et al., J. Neurochem. 57: 1971-1977 (1991)]により分離・回収し、培養する。培養の後、細胞のクローニングは、特異抗体を利用した濃縮・選別法、コロニー形成法〔Endocrinology 136: 4084-4091 (1995)〕、限界希釈法などにより行われ、数回のクローニングの後に、株化細胞を樹立するこ

とができる。特異抗体を利用した目的細胞の選別には、ターゲット細胞が特異的に発現しているマーカーに対する特異抗体を利用するものが挙げられる。トランスジェニックラットから継代維持可能な細胞を得る場合には、マウスやウサギで作製された抗体を利用することが可能であり、優れている。該マーカーとしては、オプシン、トランスデューション、S抗原、ホスデューション、ロドプシン、Thy 1.1抗原、microtubule-associated protein2、calbindin D28などが挙げられる。ターゲット細胞の選別は、上記マーカー遺伝子の発現の有無によって行うこともできる。該遺伝子発現は、Polymerase Chain Reaction (PCR)法、Reverse Transcriptase (RT)-PCR法などにより行うことができる。

【0013】PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えば R. Saiki et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki et al., Science, 239: 487, 1988; M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988); H. A. Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press, 1989; M. A. Innis et al. (ed.), "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); D. M. Glover et al. (ed.), "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. (ed.), "PCR Applications: Protocols for Functional Genomics", Academic Press, New York (1999)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参考することにより本明細書の開示に含められる）。また、PCR法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。PCR法では、通常適切なプライマーが使用されるが、該プライマーとしては、オリゴヌクレオチドを使用できる。

【0014】「オリゴヌクレオチド」は、通常、短い長さの、一本鎖または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドであり、これは、公知の方法（例えば、EP 266,032に記載されるような固相技術など）を使用して化学的に合成される。こうした方法としては、例えば、ホスホトリエヌクレオチド法、ホスファイト法、またはホスホルアミダイト法、またはFroehler et al., Nucl. Acids Res. 14, 5399 (1986)によって記載されるような方法が挙げられる。次いで化学的に合成されたものは、ポリアクリルアミドゲル上で精製される。

【0015】本発明の継代可能な網膜神経細胞株は、網

膜神経細胞の有する機能をほとんど保持したまま株化した継代して維持することのできる細胞を意味する。本発明の継代可能な網膜神経細胞株としては、例えば網膜神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞、双極細胞、視細胞などが挙げられる。本発明の一態様でもある温度感受性突然変異SV40ラージT抗原遺伝子導入哺乳動物の眼球から得る場合、その細胞株は不死化網膜神経細胞株となり安定に保持できる。トランスジェニック動物の樹立は、特開平5-292958号公報（特許第2,988,753号公報）などで行うことができる。本発明の好ましい一態様では、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子、例えばSV40tsA58 DNAを導入したトランスジェニックラットから、それぞれ株化網膜視神経細胞および株化網膜神経節細胞を樹立できる。具体的な株化網膜視神経細胞の樹立につき説明すると、上記特許第2,988,753号公報の記載に従い、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子SV40tsA58を導入して作出したトランスジェニックラットからその眼球を出発生体組織として取り出し、網膜組織を分離して、トリプシン、コラゲナーゼなどの酵素で処理し、細胞を分散した状態にしてから、該細胞懸濁液を培養する。

【0016】培養に使用する培地としては、公知のものあるいは市販のものを適宜使用することが出来る。該培地には、炭素資化源、窒素資化源などが含まれる。該培地は、無機塩類、アミノ酸、ビタミン類、糖類、血清、ホルモン、成長因子、抗生物質などが適宜配合されている。該培地は、緩衝剤、浸透圧調整剤などにより培養に適した状態にされたものである。細胞培養は、好ましくは細胞外基質の存在下に行われる。該細胞外基質としては、I～IV型コラーゲン、ファイブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどが挙げられる。また細胞培養には、コートされた担体などを好適に使用できる。該コートされた担体としては、ポリ-L-リジンコート、コラーゲンコート、ゼラチンコート、ファイブロネクチンコートなどされたディッシュなどの培養用の容器が挙げられる。培養された細胞はそれぞれに特異的なマーカーを使用して分離される。例えば視神経細胞の場合、ロドプシンをマーカーとして利用することが可能で、先ず抗ロドプシン抗体を目的の視神経細胞を含有する細胞懸濁液と接触せしめ、次に視神経細胞に結合している抗ロドプシン抗体に特異的に結合するリガンド（例えば該抗ロドプシン抗体がマウスモノクローナル抗体を用いているのであれば、ウサギの抗マウス抗体）を固定化したカラムを使用するなどして、視神経細胞を選択的に分離できる。また、ある程度、他の網膜由来細胞から分離されたなら、限界希釈法により、單一なクローンとなるまでクローニングを行うことができる。同様な手法で、例えば網膜神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞、双極細胞などを得ることができる。

【0017】これらの細胞株は、各種生理活性因子、分

化誘導因子および分化抑制因子の生産に利用できる。さらに組換えDNAクローニング宿主、遺伝子供与体としても使用できる。また、網膜神経細胞特異的マーカーの作成や、それに対する抗体の作成に有用である。得られた網膜神経細胞特異的マーカーに対するマウスなどの抗体を基に、ヒトの抗体も通常の遺伝子操作技術で取得可能となる。この抗体は、細胞移植等の際に、網膜神経細胞の分離、同定、定量等に必要となる。本明細書中、用語「抗体」は最も広い意味で使用され、そして特に、それらが所望の生物学的活性を示す限りは、單一のモノクローナル抗体、多エピトープ特異性を有する抗体組成物、ならびに抗体フラグメント（例えば、Fvなど）を含んでよい。

【0018】用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体集団から得られる抗体をいう。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、天然に存在する可能性のある変異体が、少量そこに存在することもある点を除いて、互いに同一である。モノクローナル抗体は特異性が高く、單一の抗原部位を認識するものである。さらに、代表的には異なる抗原決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むといった従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の單一の抗原決定基を認識するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらがハイブリドーマ培養物によって合成され、他の免疫グロブリンが混入されていない点で有利な点を持っている。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られるような抗体の特徴を示すことを意味し、そして任意の特定の方法による抗体の産生をそこに必要とするというには解釈されるべきでない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ケラー（Kohler）およびミルシュタイン（Milstein）、Nature（London）256: 495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製されることが出来るか、または組換えDNA法によって作製されることができる（例えば、米国特許第4,816,567号（Cabilly et al.）を参照のこと）。

【0019】本発明で使用されるモノクローナル抗体は、Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991) や Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991) に記載の技術を使用して、抗体のファージライブリーカーからも単離することができる。本明細書中のモノクローナル抗体は、特に、それが所望の生物学的活性を示す限りは、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種由来のまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかもしくは相同であっても、鎖の残りが、別の種由来のまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかもしくは相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびにそのような抗体のフラグメン

トを含んでよい（米国特許第4,816,567号：Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855 (1984)）。

【0020】非ヒト抗体（例えば、マウス抗体）の「ヒト化」形態のものとしては、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合配列）であって、それらは非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むものである。大部分の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（complementarity-determining region: CDR）の残基をマウス、ラット、またはウサギといったような非ヒト動物（ドナー抗体）であり且つ所望の特異性、親和性、および能力を有するCDRに由来する残基によって置換してあるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体および導入されたCDRまたはフレームワーク配列のいずれにおいても見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに優れたものあるいは最適なものとするために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、および代表的には2つの可変ドメインの実質的な全てを含み、ここで、全てまたは実質的な全てのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応する。さらに詳しくは、Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); EP-B-239400; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992); およびEP-B-451216を参照することができる。

【0021】また、本発明の細胞株は、網膜移植および遺伝子治療に利用できる。更に、本細胞株は網膜細胞の分化などの研究に応用できる。本発明で得られた細胞株を用いて分子レベルでその分化などの仕組みが理解できるようになり、引いては、各種機能を有する因子が得られる。これらの因子は、医薬品としての利用も考えられる。その他、本細胞株自身の生産する新しいサイトカインの生産およびそのクローニング等にも用いることができ、また、様々な物質の薬理試験、毒性試験等にも使用できる。特に本発明の株化視細胞は、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などの眼科疾患に対する作用薬物のスクリーニングなどに有用である。また、本発明の株化網膜神経節細胞は、緑内障、中心動脈閉塞症などの眼の虚血性疾患などの眼科疾患に対する作用薬物のスクリーニングなどに有用である。本発明の株化アマクリン細胞は、糖尿病性網膜症、中心動脈閉塞症などの眼の虚血性疾患などの眼科疾患に対する作用薬物のスクリーニングなどに有用である。

【0022】本発明の継代維持可能な網膜由来の神経細胞株を用いれば、対象神経細胞株の機能的な活性あるいは作用（例えば、生物学的活性又は作用など）を促進

（あるいは増強）する又は阻害（あるいは抑制）する化合物を同定するための、化合物のスクリーニング方法が提供される。例えば、網膜神経細胞内又は細胞上で、ある特定のタンパク質結合分子（例えば受容体に対するリガンド及び酵素基質分子など）と該対象タンパク質（例えば受容体及び酵素など）との相互作用を促進（あるいは増強）する化合物又は該相互作用を阻害（あるいは抑制）する化合物を同定するための、化合物のスクリーニング方法をも提供する。該促進する化合物（アゴニスト）は対象（目的）タンパク質の天然の生物学的機能を促進（あるいは増強）する化合物であり、一方該阻害する化合物（アンタゴニスト）は、このような機能を低下せしめる化合物又は該機能を阻害（あるいは抑制）する化合物である。本発明の継代維持可能な網膜由来の神経細胞株、及び該細胞から得られる調製物（例えば、細胞フラクション、例えば膜、空胞、封入体（inclusion）あるいはそれらの任意の調製物など）を、当該対象タンパク質アゴニスト又はアンタゴニストに成り得る候補分子の存在下又は不在下で、必要に応じて検出用の標識化物と共に、インキュベートする。候補分子が該対象タンパク質（例えば受容体及び酵素など）と結合しても、該タンパク質結合分子の結合に対して該対象タンパク質に対して影響を与えるような作用を誘起しないものは、最も良好なアンタゴニストになるであろう。一方、候補分子が該対象タンパク質と結合して、該タンパク質結合分子と同一の効果又は非常に関連した効果を引き出すものは、アゴニストである。本発明に従って得られた、代表的な継代維持可能な網膜由来の神経細胞株、例えばラットの継代維持可能な網膜由来の神経細胞株は、33°Cの培養条件下では、large T遺伝子の発現により増殖能を持ち、継代維持可能であるが、37°Cの培養条件下では、large T遺伝子発現の消失が生起し、徐々にアポトーシスによる細胞死に至るという性状を有している。該ラットの継代維持可能な網膜由来の神経細胞株を使用し、(1)37°Cの培養条件下によって誘導される細胞死に対する脳由来神経栄養因子(BDNF)などの生理活性因子の保護作用、(2)低酸素負荷及びグルタミン酸によって引き起こされる細胞死に対するBDNFなどの生理活性因子の保護作用のメカニズム解明などを行うことが可能であり、有用である。

【0023】本明細書において、用語「細胞（cell）」、「細胞株（cell line）」、および「細胞培養物（cell culture）」は互いに交換可能に使用され、そして全てのこのような呼称は、その子孫を含む。全ての子孫は、故意または偶然の変異によって、DNA含有物について正確には同一でなくても良いことが理解されよう。そこには、元の樹立された株化細胞においてスクリーニングされたのと同じ機能または生物学的特性を有する変異体子孫が含まれる。本発明の測定方法において、個々の免疫学的測定法を適用する場合、そこでは、特別の条件、操作等

の設定は通常は特には必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該対象物質あるいはそれと実質的に同等な活性を有する物質に関連した測定系を構築すればよい。

【0024】これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができ、例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第2版）、医学書院、昭和57年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第3版）、医学書院、昭和62年発行；H. V. Yunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques; Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

【0025】本発明において使用されるDNAクローニング技術においては、その具体的な操作並びに処理条件などは、例えばJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (ed.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual

(2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. (ed.), "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。また、細胞培養などの具体的な操作並びに処理条件などは、例えば William B. Jakoby et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 58 (Cell Culture), Academic Press, New York (1991) 及びその他のMethods in Enzymology シリーズ (Vol. 1-317), Academic Press, New York; Jennie P. Mather et al. (ed.), "Methods in Cell Biology", Vol. 57 (Animal Cell Culture Methods), Academic Press, New York (1991) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

【0026】

【実施例】以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。下記の例で使用する主な略号：

BSA: bovine serum albumin

EBSS: Earle's balanced salt solution

SV40: simian virus 40

NPBM: Neural Progenitor Basal Medium

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

40 PBS: phosphate-buffered saline

【0027】実施例1

(i) 動物組織からの網膜構成細胞の分離

SV40の温度感受性変異株のラージT 抗原遺伝子SV40tsA58 を導入した6～10日齢のトランスジェニックラット (F1) 2匹（ワイエスニューテクノロジー研究所より入手：特開平5-292958号公報（特許第2,988,753号公報）記載の手法で得られた）から眼球を摘出し、網膜神経細胞の分離に用いた。摘出した眼球は、氷冷下で赤道部にそって半割し、角膜、虹彩、毛様体を除去した。神経網膜は脈絡膜から剥離し、EBSS中に集めた。網膜は、15 U

/ml のパパイン (シグマ社製) で37°Cで30分間処理した。bovine serum albumin (BSA, 2mg/ml, シグマ社製), DNase I (10kU/ml, シグマ社製), ovomucoid (4mg/ml, ベーリンガーマンハイム社製) を加え、1ml ピペットを用いて細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を1000×g で5分間遠心して細胞を回収した。細胞は培地で懸濁し、1% アガロースをコートしたディッシュで1～3日間、浮遊培養を行った (第1図)。1～3日間の浮遊培養後、poly-D-lysine コートのディッシュで培養を行った (第2図)。培養期間中、培地として10% ウシ胎児血清を含むNPBM培地 (Neural Progenitor Basal Medium, Clonetics 社) を用いて33°Cで培養した。これらの細胞の遺伝子発現について、RT-PCR法により調べた (第3図)。

【0028】(ii) 細胞のクローニング

細胞のクローニングには、1. 特異的な抗体を用いた濃縮、2. コロニー形成法、3. 限界希釀法の3つを用いた。

(a) 視細胞のクローニング

視細胞はロドプシンを発現していることから、ロドプシン抗体 (Ishiguro et al, J.B.C., 266(23), 15520-4, 1991) を用いて視細胞を濃縮した。35mm poly-D-lysine コートのディッシュ上で培養した網膜細胞をCTC 液 (コラゲナーゼ, 100u/ml, トリプシン, 0.1%、ニワトリ血清, 2%、EDTA, 4mM) を用いて細胞をディッシュから剥離し、1000×g で5分間遠心して細胞を回収した。BSA (0.5 %、シグマ社) を含むPBS (PBS-BSA) で細胞を洗浄し、続いてロドプシン抗体を含むPBS-BSA に懸濁した。4°Cで10分間インキュベートした。細胞を2回、PBS-BSA で洗浄した後、microbeads-conjugated anti-rabbit IgG を含むPBS-BSA で4°C、15分間インキュベートした。細胞を2回洗浄した後、PBS-BSA に懸濁し、mini-MACS separation column (第一化学) を用いて、ロドプシン抗体陽性細胞を分離した。この細胞を100mm ディッシュに100 個播き、コロニーが形成されるまで培養した。コロニーが形成されたら、クローニングカップをコロニーを囲むように置き、CTC 液を用いて細胞をディッシュから剥がした。この細胞を35mm poly-D-lysine コートのディッシュに播き、増殖を始めたら、ディッシュから剥がして、96wellプレートに1 wellにつき1～10個となるように細胞を播いた。このプレートから増殖した細胞をロドプシン抗体で染色し、視細胞であることを確認した。

【0029】(b) 他の細胞のクローニング

視細胞以外の他の細胞のクローニングについても視細胞と同様に行った。神経節細胞は特異的に Thy 1.1、アマクリン細胞は microtubule-associated protein 2 (MAP-2)、双極細胞は calbindin D28 を発現している。そのため、視細胞と同様に、それぞれの抗体を用いて細胞を濃縮し、コロニー形成法、限界希釀法により細胞をクローニングした。使用される抗体としては、例えば、次のものが挙げられる：

Mouse anti-Thy1.1 monoclonal antibody:

clone OX-7, Chemicon International Inc, CA, USA, Lake, et al., Eur. J. Immunol., 9: 875-886 (1979); Mouse anti-Microtubule associated protein-2 monoclonal antibody:

clone 5F9, Upstate biotechnology, NY, USA, Shelanski, et al., PNAS, 70: 765-768 (1973); Mouse anti-Calbindin D28 monoclonal antibody:

clone CL-300, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA;

Rabbit anti-Rhodopsin polyclonal antibody:

Ishiguro et al, J.B.C., 266(23), 15520-4, 1991

【0030】(iii) 株化細胞の特性

(1) 視細胞

視細胞では、オプシン、トランスデューション、S 抗原、ホスデューションなど視細胞に特異的な遺伝子発現が知られている。これらの遺伝子の発現について、RT-PCR法により調べたところ、すべての遺伝子の発現が確認された (第4図)。また、生体内においてトランスデューションの発現量はオプシンの約1/10であることが知られている

20 が、今回クローニングした視細胞においてもトランスデューションの発現量は生体内と同様にオプシンの約1/10であることが分かった。ロドプシン抗体を用いて、免疫組織化学を行ったところ、すべての細胞がロドプシン抗体陽性であった (第5図)。網膜の視細胞は、種々の疾患で変性することが知られている。遺伝性疾患である網膜色素変性症、加齢に伴う加齢黄斑変性などがある。これらの視細胞変性に対して、広く研究が行われており、遺伝性に視細胞変性を伴う動物が実験モデルとして使われることが多い。すでにこれらの動物を使用し、多くの栄養因子が視細胞変性に保護的に働くことが知られている。

30 これら因子が、今回クローニングした視細胞の細胞死において、保護的に働くかどうかについて調べた。今回クローニングした視細胞、多くの神経細胞と同様に血清除去によっても死に至ることから、血清除去による細胞死に対する保護効果について調べた。24時間の血清除去により、tsSV40p-1 の生存率は約7 %であったのにに対し、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF) を培地中に添加したtsSV40p-1 では濃度依存的に細胞死が抑制された (第6図)。

【0031】(2) 神経節細胞

神経節細胞では、Thy 1.1 抗原が発現していることが知られている。この遺伝子発現について RT-PCR 法により調べたところ、発現が確認された。

(3) アマクリン細胞

アマクリン細胞では、 microtubule-associated protein 2 (MAP-2) が発現していることが知られている。この遺伝子発現について RT-PCR 法により調べたところ、発現が確認された。本発明で得られた上記網膜神経細胞株は、

50 30代の継代の後も、上記したような遺伝子の発現がある

ことが確認される。かくして本発明では、株化網膜神経細胞として、神経節細胞、アマクリン細胞、視細胞、水平細胞が得られていると判断される。また、上記実施例中PCRに使用されるのに適したプライマーとしては、例えば、次のものが挙げられる：

Thy1,1

5'-TGCGGTCAATGAGAATAACACC-3'

5'-TTATGCCACCACTTGACC-3'

Microtubule associated protein-2 (MAP-2)

5'-CCTGCAGTGGAGAAGATTCC-3'

5'-CTGTCATCAGCAACAGGTGG-3'

Opsin

5'-AGTGACAGGATGGTCCTTGG-3'

5'-TGAGAGTCCTCAGCAACTGG-3'

Phosducin

5'-ATGAGCATTCAAGAATATGAA-3'

5'-CAGCTCATACACAAACCCATA-3'

Transducin

5'-CTAACATTCAGTATGGAG-3'

5'-TGAGTCTCGATAATACCAAG-3'

S-antigen

5'-TTCAGTGATGTTGCAGCCAGC-3'

5'-GTGTTTCCCTCGAGGCTACAG-3'

5'-GTCAAAGTGCTGTTGGCTGC-3'

phosphodiesterase

5'-GTGTCAATATGGAACGTGTGG-3'

5'-GTAGTCGGTGAGCTCATCGG-3'

本発明に従って、ラットの網膜細胞株を得ることができ、それにより、これまでラットで得られて蓄積されたデータを含めた技術を有利に利用することが可能となり、眼科領域の研究において優れた技術手段を提供する。特に、上記で指摘してきた神経保護作用に関する研究開発においては、ラットを使用するのが研究の主流であり、この点でも注目される技術手段を提供する。初代培養のインビトロ実験系では、その効果が悪い（実際上、多くの動物から細胞を分散培養しても、維持が困難で特定細胞に対する薬物の反応を見ることはほとんどで

きない）が、これに対して本発明により、格段に効率を高めることができ可能となり、薬物スクリーニング使用に適した継代維持可能細胞株を提供している。

【0032】

【発明の効果】本発明により、温度感受性変異株SV40ラージT抗原遺伝子導入ラットより網膜を分離培養して、継代維持可能な網膜神経細胞を得ることが可能となった。継代維持可能な細胞として、網膜神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞及び視細胞を樹立できる。該継代

10 維持可能な網膜神経細胞を利用して、種々の網膜疾患に対する神経保護作用を有する薬物の開発に利用できる。不死化細胞を使用して、網膜神経細胞に係わる研究を培養系で行うことが可能となり、神経保護薬などの有用薬物の開発を効率よく行うことが可能となる。本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

【図面の簡単な説明】

20 【図1】 トランスジェニックラットより得られた網膜細胞を分離後3日間浮遊培養した後の細胞の形態を示す写真。

【図2】 poly-D-lysine コートのディッシュで培養した後のトランスジェニックラットより得られた網膜細胞の形態を示す写真。

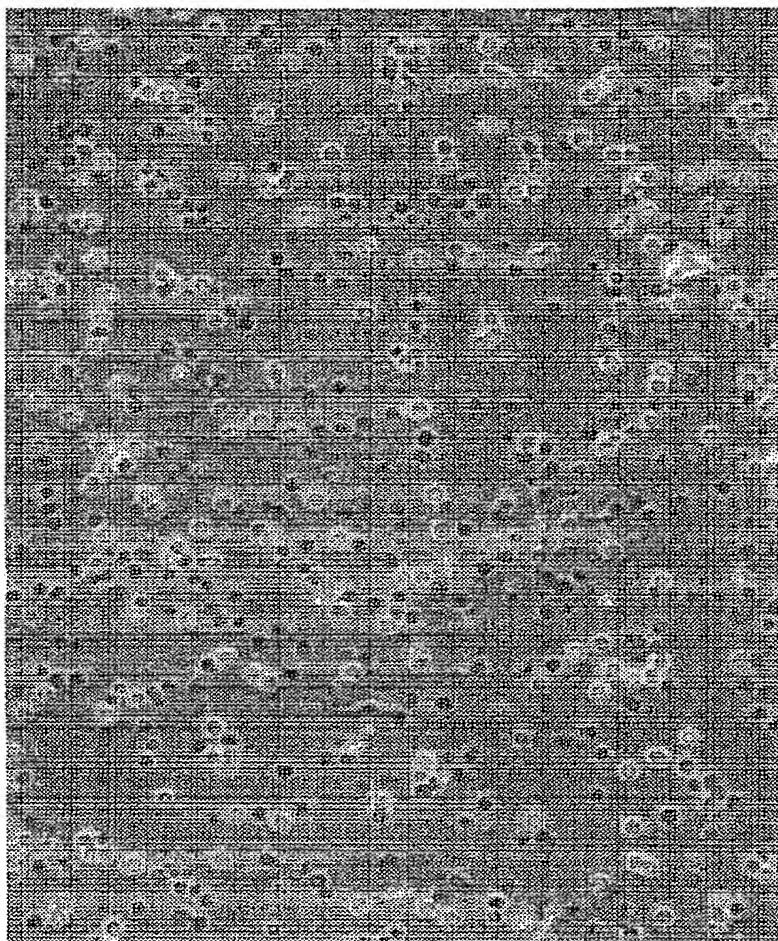
【図3】 トランスジェニックラットより得られた培養網膜細胞につき、RT-PCR法により遺伝子発現を調査した結果を示す電気泳動の写真。

30 【図4】 株化視細胞での、オプシン、トランスデューサン、S抗原、ホスデューサン遺伝子の発現について、RT-PCR法により調べた結果を示す電気泳動の写真。

【図5】 株化視細胞での、ロドプシン抗体を用いた免疫組織化学試験の結果を示す写真。

【図6】 株化視細胞を使用しての血清除去による細胞死に対する保護効果試験の結果を示す。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) :毛様体神経栄養因子 (CNTF) :脳由来神経栄養因子

【図1】



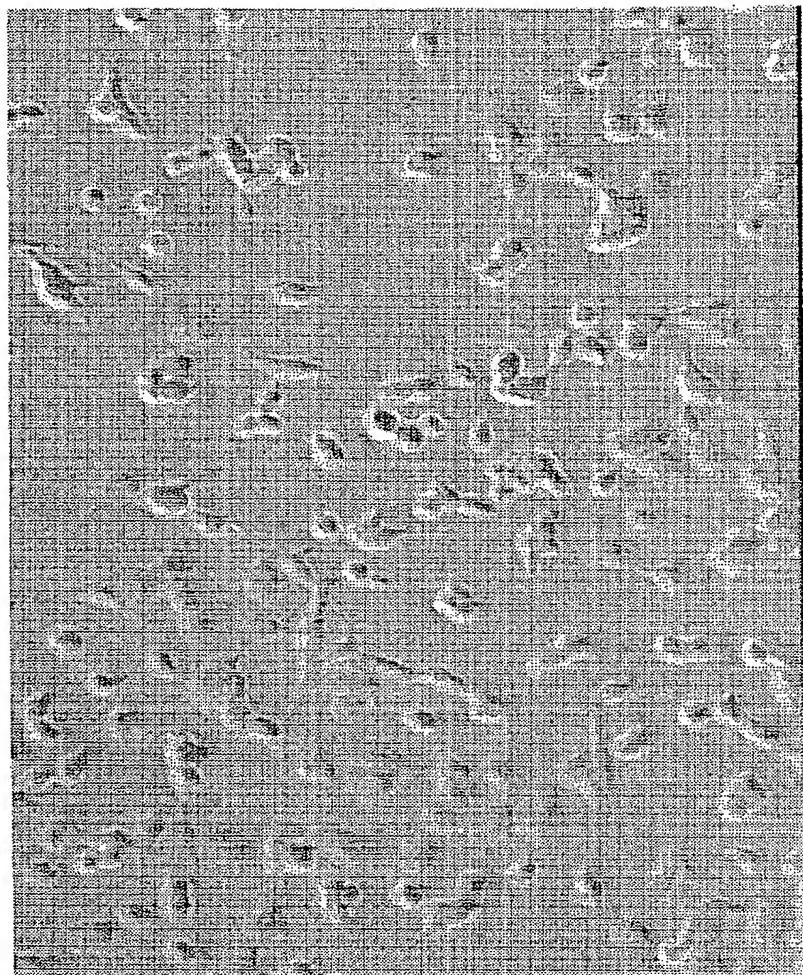
【図4】

1 2 3 4 5 6 7 8 9

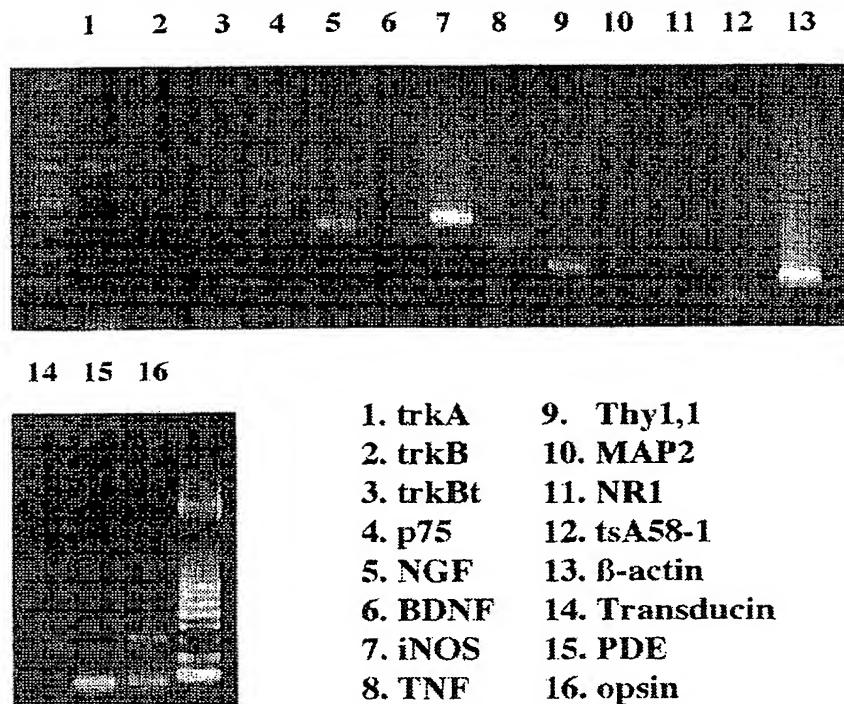


1. negative control
2. β -actin
3. phosducin
4. S-antigen
5. S-antigen
6. transducin
7. phosphodiesterase
8. opsin
9. 100bp ladder marker

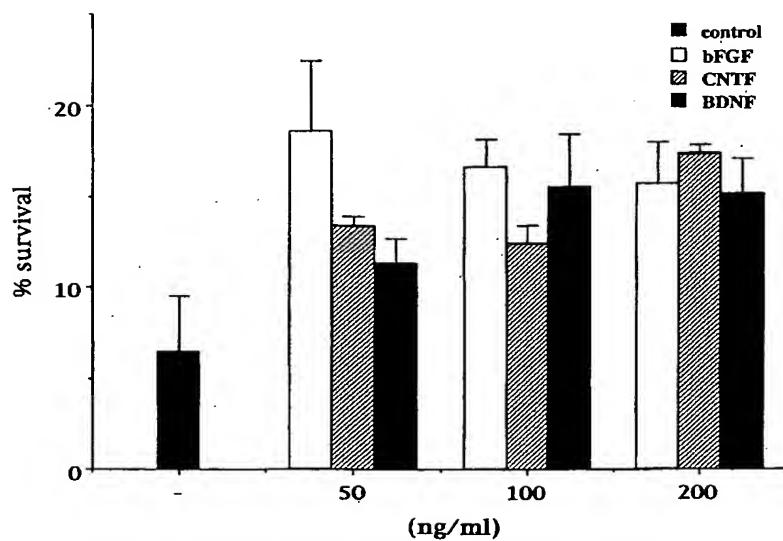
【図2】



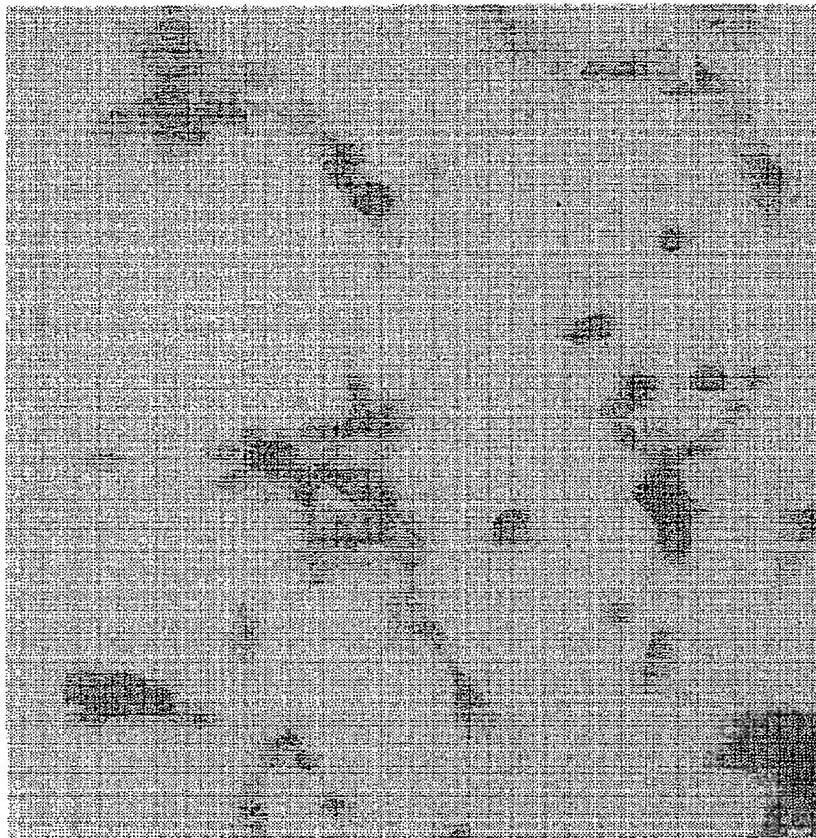
【図3】



【図6】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	マーク一 (参考)
G 0 1 N 33/50		A 6 1 K 45/00	
// A 6 1 K 45/00		C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 N 5/10		(C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 R 1:91)		15/00	A
		C 1 2 R 1:91)	

(72) 発明者 帯刀 益夫
 宮城県仙台市青葉区八幡5丁目3-10-
 402

(72) 発明者 上田 正次
 埼玉県川越市今福1672-1-719

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB14 BB24 BB41 CB01
FB02
4B024 AA11 BA31 BA63 BA80 CA04
DA02 FA10 GA18 GA23 GA27
HA14 HA15 HA17
4B063 QA01 QA18 QA20 QQ08 QQ13
QQ43 QQ96 QR08 QR32 QR35
QR40 QR42 QR55 QR62 QR66
QS25 QS33 QS34 QX02
4B065 AA91X AA91Y AB01 AC01
AC20 BA02 BA06 BA25 BB01
CA24 CA46
4C084 AA16 NA20 ZA332 ZC782